



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EFEITO DO RELAXAMENTO INDUZIDO POR DIOSGENINA EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE
17- β ESTRADIOL.

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

João Pessoa – PB
Junho de 2014

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO DO RELAXAMENTO INDUZIDO POR DIOSGENINA EM ARTÉRIA
MESENTÉRICA DE RATO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE 17- β ESTRADIOL.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado junto ao curso de Farmácia
da Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial à obtenção do Título de
Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Katy Lísias Gondim Dias de Albuquerque

JOÃO PESSOA

2014

S586e

Silva, Juliane Santos de França da.

Efeito do relaxamento induzido por diosgenina em artéria mesentérica de rato após administração de 17- β estradiol / Juliane Santos de França da Silva. -- João Pessoa: [s.n.], 2014.
33f. : il.

Orientadora: Katy Lísias Gondim Dias de Albuquerque.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Diosgenina. 2. Vasorelaxamento. 3. Estradiol.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615(043.2)

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO DO RELAXAMENTO INDUZIDO POR DIOSGENINA EM ARTÉRIA
MESENTÉRICA DE RATO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE 17- β ESTRADIOL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia,
da Universidade Federal da Paraíba
como requisito parcial a obtenção do
título de farmacêutico.

Monografia aprovada em ____ / ____ / ____

Prof^a. Dr^a. Katy Lísias Gondin Dias de Albuquerque
Orientadora – UFPB

Prof^a. Dr^a. Nadja de Azevedo Correia
Examinador – UFPB

Prof^a. Dr^a. Karla Veruska Marques
Examinador – UFPB

*A minha mãe, meu pai, meus
irmãos, minha avó Nevinha e ao
meu namorado Guilherme.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, que na sua infinita bondade me fez capaz de discernir, entre tantos caminhos, o que me levaria à honradez, à integridade, a cidadã que hoje sou.

A minha orientadora, professora Katy Lísias pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação com que me auxiliou na conclusão deste trabalho, sem dúvidas foi a melhor orientadora que eu poderia ter.

Aos meus pais, que me carregaram enquanto aprendia a caminhar com os meus próprios passos e continuam me guiando, apoiando as minhas escolhas e aplaudindo as minhas conquistas, sem o esforço deles essa vitória não teria sido possível.

Aos meus queridos irmãos e a minha avó Nevinha pelo carinho de sempre, o amor que sinto por eles é o que me impulsiona.

A Guilherme Urquiza, por estar comigo nos momentos mais difíceis e pelo incondicional apoio na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, em especial aos do curso de Farmácia, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu amigo Daniel Ferreira, que mesmo não estando mais entre nós eu sinto sua presença em cada coisa boa que acontece em minha vida.

Ao Professor Isaac de Almeida Medeiros, sem ele a concretização desse trabalho não teria sido possível.

A todos, muito obrigado!

“O sucesso é ser feliz”

Roberto Shiniashiki

RESUMO

A doença cardiovascular constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres após a menopausa, a depleção de estrógenos em especial do 17- β estradiol é considerada um fator condicionante. Atualmente tem-se buscado nos estudos com fitoestrógenos uma possível alternativa para melhorar o tratamento dessa enfermidade, uma vez que a terapia de reposição hormonal traz prejuízos à pacientes com câncer de mama ou útero. Dentre os vários fitoestrógenos existentes procuramos avaliar a atividade cardiovascular de diosgenina, fitoestrógeno presente em espécies do gênero *Dioscorea* que possui estrutura semelhante ao estradiol e é usado para síntese em larga escala de diferentes hormônios esteroidais. O objetivo do presente estudo foi investigar se o efeito relaxante induzido por diosgenina, seria alterado pelo estradiol e verificar se a diosgenina e o estradiol modulavam o tônus basal de anéis mesentéricos. Para tanto utilizou-se artéria mesentérica superior isolada de ratos *Wistar* de forma que as mesmas foram seccionadas em anéis e esses postos em um sistema de cubas para órgãos isolados. Foi constatado inicialmente que concentrações de diosgenina administradas cumulativamente às cubas não alteraram o tônus basal destes anéis, tanto na ausência como na presença do endotélio funcional. Resultados similares foram obtidos com a administração cumulativa de concentrações crescentes de 17- β estradiol o que sugere que diosgenina ou 17- β estradiol parecem não modificar o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato. A administração de concentrações crescentes de diosgenina ou 17- β estradiol induziu um relaxamento dependente de concentração na presença do endotélio e na ausência do mesmo, sugerindo que a diosgenina, assim como o 17- β estradiol, apresentam efeito relaxante dependente e independente de endotélio funcional. O efeito relaxante mediado por concentrações crescentes de diosgenina foi significativamente potencializado após a incubação da preparação por trinta minutos com o 17- β estradiol o que sugere que o 17- β estradiol é capaz de potencializar o relaxamento induzido por diosgenina em artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio. Entretanto, estudos posteriores são necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação envolvido nesta potencialização.

PALAVRAS-CHAVES – diosgenina, vasorelaxamento, estradiol

ABSTRACT

Cardiovascular disease is a major cause of morbidity and mortality in post-menopausal women, estrogen depletion in particular 17- β estradiol a conditioning factor. Currently researchers have attempted, in studies with phytoestrogens, an alternative to improve the treatment of this illness, since hormone replacement therapy harms to patients with breast or uterine cancer. Among various existing phytoestrogens tried to assess the cardiovascular activity of diosgenin, found in species of the genus *Dioscorea* that has similar structure to estradiol and phytoestrogen is used for large scale synthesis of various steroid hormones. The purpose of this study was to investigate whether the relaxing effect induced by diosgenin, would be altered by estradiol and verify whether diosgenin and estradiol would modulate the basal tonus of mesenteric rings. To do this were used the superior mesenteric artery, isolated from Wistar rats, then they were cut into rings and putted inside a system of tanks for isolated organs. Was initially discovered that concentrations of diosgenin dosed cumulatively to the organ chambers did not modify the basal tonus of these rings, both in the absence and on the presence of a functional endothelium. Similar results were collected after administration of increasing cumulative doses of 17- β estradiol diosgenin, which suggests that 17- β estradiol not seem to modify the basal tonus of superior mesenteric artery isolated of rats. The administration of increasing concentrations of diosgenin or 17- β estradiol induced a concentration-dependent relaxation of endothelium, both in the presence and absence of the same, that suggests diosgenin, as well as 17- β estradiol, have dependent and independent relaxant effect of functional endothelium. The relaxation effect mediated by increasing concentrations of diosgenin was significantly potentiated after the thirty minutes incubation with the 17- β estradiol which suggests that 17- β estradiol is capable of enhancing the relaxation induced by diosgenin in superior isolated mesenteric artery of a rat in the presence and absence of the endothelium. However, further studies are required to clarify the action mechanism involved in this enhancement.

Keywords: diosgenin, vasorelaxation, estradiol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.	OBJETIVOS.....	18
4.	MATERIAIS.....	19
5.	MÉTODOS.....	20
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
7.	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Estrutura química de diosgenina. _____14
- Figura 02** – Estrutura química de diosgenina, progesterona e estradiol. _____15
- Figura 03** - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença do endotélio vascular. _____23
- Figura 04** - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular. _____24
- Figura 05** - Efeito de concentrações crescentes de 17- β estradiol sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença do endotélio vascular. _____24
- Figura 06** - Efeito de concentrações crescentes de 17- β estradiol sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular. _____24
- Figura 07** - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN na presença do endotélio vascular. _____26
- Figura 08** - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN na ausência do endotélio vascular _____26
- Figura 09** - Efeito de concentrações crescentes de 17- β estradiol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN na presença e na ausência do endotélio vascular. _____26

Figura 10 - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN na presença do endotélio vascular antes e após administração de 17- β estradiol. _____28

Figura 11 - Efeito de concentrações crescentes de diosgenina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN na ausência do endotélio vascular antes e após administração de 17- β estradiol. _____ 28

1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres após a menopausa, ultrapassando o total de óbitos causados por câncer. No Brasil, as doenças circulatórias representam a causa principal de morbidade e mortalidade (REVISTA PORTUGUESA DE CARDIOLOGIA., 2013).

Estudos experimentais vêm colaborando para o melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento do risco cardiovascular após a menopausa (SHWAERY et. al., 1997). Estes estudos sugerem que o principal mecanismo de cardioproteção dos estrógenos seria a preservação da função endotelial, pela inibição da proliferação da célula muscular lisa, das ações antioxidantes e da melhora da reatividade vascular, os quais induziriam um melhor equilíbrio na função vasodilatadora/vasoconstrictora, com consequente diminuição dos riscos cardiovasculares (LIMA et. al., 2001).

A hipertensão arterial, associada a pós-menopausa, aumenta o risco de doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, doença vascular periférica e aneurisma dissecante da aorta (LIMA, 2001).

As mulheres, antes da menopausa, são menos susceptíveis à hipertensão e a doenças cardiovasculares do que os homens na mesma faixa etária (ROETERS, 2002 e WENDY, 2011). Entretanto, após a menopausa, a incidência de doenças coronarianas e a hipertensão são aceleradas nas mulheres comparadas com os homens da mesma idade (RECKELHOFF, 2001), sugerindo que o 17- β estradiol (principal estrogênio liberado pelos ovários) possui um importante papel na prevenção destas doenças cardiovasculares.

Estudos relatam que mulheres na pós-menopausa, portadoras de hipertensão arterial essencial, quando submetidas à reposição com estrogênios, apresentam melhora de seu quadro hipertensivo. A elevação da pressão sistólica relaciona-se à aterosclerose, principalmente das grandes artérias, e também à carência estrogênica que ocorre desde o início da falência gonadal (LIMA, 2001).

É importante ressaltar que os principais estrógenos produzidos pela mulher são o estradiol (E_2), a estrona (E_1) e o estriol (E_3), sendo a estrona e o estriol (que exibem baixa afinidade pelas isoformas α e β do receptor do estrogênio) produzidos

em maior parte no fígado a partir do estradiol e no tecido adiposo a partir androstenodiona, esteróide da supra-renal (DIAS, 2006).

O 17- β estradiol (estradiol) é um estrógeno endógeno produzido pela mulher capaz de ativar canais de potássio ativados por cálcio de larga condutância ($BK_{\text{cálcio}}$). Além disso, em concentração fisiologicamente relevante (na faixa de nanomolar), este hormônio ativa a adenilato ciclase, melhora o relaxamento e reduz a contração em artéria coronária de suínos (WENDY et. al, 2011).

A terapia de reposição estrogênica diminui o risco de enfermidade cardiovascular por melhorar o perfil lipídico (reduzir os níveis circulantes de c-LDL e aumentar a concentração plasmática de c-HDL), modulação do funcionamento endotelial, síntese de prostaciclina e óxido nítrico e diminuição da agregação plaquetária e do fibrinogênio (MARQUES et. al., 2006).

É bem reportado na literatura que a suplementação do estrogênio causa relaxamento em vasos pré-contraídos na ausência do endotélio funcional, incluindo artéria mesentérica (SHAW, 2000), coronária (MUGGE, 1993) e aorta (JIANG, 1991). A terapia de reposição hormonal alivia os desconfortos da menopausa, porém, é perigosa para mulheres com suspeita ou diagnóstico de câncer de mama e de útero (ZHOU et. al., 2008).

Vários efeitos adversos atribuídos aos estrógenos naturais e sintéticos tem limitado o uso deles na terapia de reposição hormonal e este fato vem contribuindo para o desenvolvimento de substâncias alternativas. Com o intuito de se buscar uma substância alternativa que possua propriedades benéficas semelhantes ao estrógeno e com menos efeitos colaterais, faz-se necessário pesquisar substâncias, como por exemplo, os fitoestrógenos, que são produtos derivados de plantas e que possuem semelhança estrutural ao estradiol.

Os fitoestrógenos, compostos presentes em uma variedade de produtos e consumidos na dieta (ex: soja, *Glycine hispida*), são considerados atualmente uma nova opção para a reposição hormonal e estão sendo usados como uma fonte alternativa para a terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres durante a menopausa (ALICE et. al., 2004).

Dentre os vários fitoestrógenos existentes, procuraremos estudar a atividade cardiovascular de diosgenina. Este fitoestrógeno possui estrutura semelhante à progesterona e ao estradiol, principal estrógeno produzido pelo ovário, e é utilizada para síntese em larga escala industrial de diferentes hormônios esteroidais, como

por exemplo a progesterona (ALICE et al., 2004). A diosgenina possui várias atividades farmacológicas, dentre elas: retarda a progressão da osteoporose (HUGHES et al., 2001); possui ação hipocolesterolêmica em ratos (JUAREZ-OROPEZA et al., 1987); efeito relaxante independente de endotélio em artéria coronária de porco via sinalização da cascata da proteína cinase G (PKG) e ativação do canal BK_{calcio} (ALICE et al., 2004) e efeito vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato dependente e independente do endotélio vascular.

Diante da emergente correlação entre a terapia de reposição hormonal em mulheres após a menopausa, utilizando fitoestrógenos, e a diminuição de doenças no sistema cardiovascular, se fazem necessários estudos adicionais sobre o papel destes fitotestrogênicos, em especial a diosgenina, em artéria mesentérica de rato, tentando elucidar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de enfermidades cardiovasculares tais como: hipertensão, vasoespasmos, aterosclerose, dentre outras.

Adicionalmente este estudo também almeja contribuir para os estudos farmacológicos da família Dioscorea e em particular do gênero Dioscorea dodecaneura.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

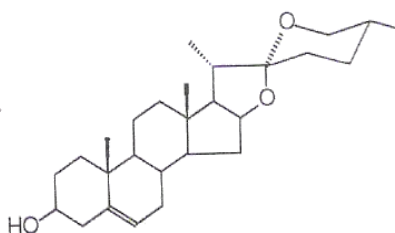
Muitas evidências apontam as plantas medicinais como a mais antiga e principal forma de medicação difundida no mundo. Até o último século, a maioria dos medicamentos foi derivada de plantas ou de fonte animal (MCNEILL; JURGENS, 2006).

Desta forma, as plantas pelas suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular. A flora brasileira é riquíssima em exemplares que são utilizados pela população para fins medicinais. Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer é denominada de planta medicinal (CRAVO, 1999). Além disso, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos.

Assim como as plantas medicinais são utilizadas na terapêutica, temos também produtos derivados de plantas que são amplamente usados na clínica, como por exemplo, os fitoestrógenos. Essas substâncias são consideradas atualmente uma fonte alternativa para a terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres durante a menopausa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Dentre os vários fitoestrógenos existentes, procuramos estudar a atividade cardiovascular de diosgenina (figura 1), que do ponto de vista químico, é caracterizada como uma sapogenina esteroidal com peso molecular 414 presente em várias espécies do gênero *Dioscorea*, dentre elas, *Dioscorea caynensis*, *Dioscorea compósita* e *Dioscorea dodecaneura*, sendo esta última conhecida popularmente como inhame, uma raiz bastante consumida pela população nordestina (ALICE et. al., 2004, DIAS et. al., 2006).

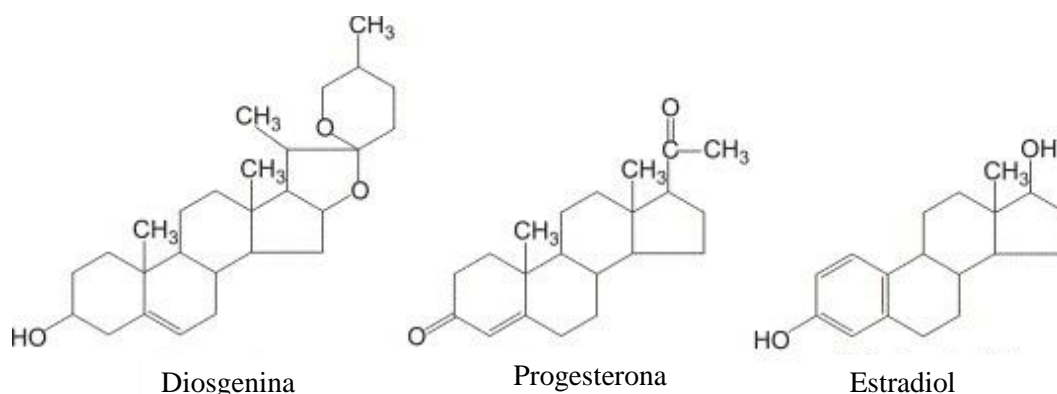
Figura 1 Estrutura Química da Diosgenina



Fonte: PATER, K. et al., 2012

Este fitoestrógeno possui estrutura semelhante a progesterona e ao estradiol, principal estrógeno produzido pelo ovário (figura 2) e é utilizada para síntese em escala industrial de diferentes hormônios esteroidais, incluindo progesterona e noretisterona (ALICE et al., 2004).

Figura 2 Estrutura química da diosgenina, progesterona e estradiol.



Fonte: DIAS, K. L. G., 2006

Dias (2006) em uma avaliação da toxicidade aguda da diosgenina em camundongos obteve os seguintes resultados: em grupos de camundongos machos e fêmeas, diosgenina na dose de 100 mg/Kg foi administrada na veia caudal destes animais e não provocou nenhuma alteração macroscópica e nem alteração do peso dos órgãos vitais avaliados: coração, fígado e rim durante os 14 dias de observação. Durante as 72 horas após a administração desta dose de diosgenina, não foi observada morte de nenhum camundongo, sugerindo que esse fitoestrógeno parece não apresentar nenhuma atividade tóxica na dose testada.

Ainda em 2006, Dias observou que diosgenina induz efeito vasorelaxante dependente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior de rato normotenso mediado pela liberação de óxido nítrico através de ativação de receptores muscarínicos e uma possível ativação dos canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V), sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e sensíveis ao cálcio de larga condutância (BK_{calcio}). Assim como, os efeitos relaxantes independentes do endotélio funcional induzidos pelo fitoestrógeno parecem envolver o bloqueio dos canais para Ca^{2+} operados por voltagem nas maiores concentrações (1 e 2 mM) e a inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a trifosfato de inositol (IP3) e cafeína nas menores concentrações (2×10^{-6} M – 7×10^{-4} M).

O efeito vasorelaxante observado pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito hipotensor observado nos experimentos in vivo. Além disto,

diosgenina apresentou atividade hipotensora e taquicárdica em animais normotensos que parece não envolver a participação da via L-arginina-NO-GMPc. Por outro lado, diosgenina não foi capaz de baixar os níveis de pressão arterial de ratos hipertensos 2R1C e hipertensos L-NAME, quando comparados com seus respectivos controles.

Evidências epidemiológicas indicam que as mulheres na pré-menopausa têm uma menor incidência de doenças cardiovasculares em comparação com mulheres na pós-menopausa, e homens de idade igual. Isto é suportado pela evidência de que a terapia de reposição de estrogênio reduz o risco de doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa em cerca de 50% (ROSSELLI et al., 1995).

Estudos realizados em aortas de ratos e coelhos mostraram que a liberação de óxido nítrico foi maior nas mulheres do que nos homens, sugerindo que a síntese de óxido nítrico é regulada por estrogênios (HAYASHI et al., 1992; KAUSER e RUBANYI, 1994). Além disso, o tratamento com 17- β estradiol em curto e em longo prazo de células endoteliais arteriais humanas e de animais cultivadas mostrou que 17- β estradiol estimula a atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), levando a um aumento da produção de óxido nítrico (HAYASHI et al., 1995; LANTIN - HERMOSO et al., 1997; STEFANO et al., 2000). Adicionalmente, várias observações sugerem que a produção de óxido nítrico, sintetizado e liberado do endotélio, era dependente do sexo (HAYASHI et al., 1992; KAUSER e RUBANYI, 1994; KNOT et al., 1999).

É importante ressaltar que o 17- β estradiol, principal estrógeno produzido pela mulher apresenta não só ação genômica clássica mediada por receptores nucleares e tirosina cinase, como também ação aguda e não genômica em músculo liso vascular de ratos, e que este efeito agudo sobre o sistema vascular pode promover uma proteção não apenas em ratas mas também em ratos (WENDY et al., 2005).

Bell (1995) demonstrou que o relaxamento endotélio-dependente, mediado pelo óxido nítrico, das artérias coronárias é reforçado por exposição de um dia para o outro, a 10^{-9} M de 17- β estradiol. Além disso, tem sido relatado que o relaxamento dependente do endotélio de artérias coronárias e outras é reforçado após exposição crônica (MILLER e VANHOUTTE, 1991; GISCLARD et al., 1988.) ou aguda (WILLIAMS et al., 1992; GILLIGAN et al., 1994), do animal ao estrogênio, bem

como após a exposição direta de vasos de animais durante a noite a níveis fisiológicos de estradiol.

3 OBJETIVOS

Diante dos efeitos benéficos observados pelo estradiol relacionados com a diminuição de doenças cardiovasculares, e de uma ação vasorelaxante da diosgenina, o objetivo desse trabalho foi investigar se o efeito do relaxamento induzido por diosgenina em artéria mesentérica de rato seria alterado após a administração de 17- β estradiol. Além disso, procuramos avaliar se estradiol e diosgenina modulavam o tônus basal destas artérias.

4 MATERIAIS

4.1 Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos normotensos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 200 e 300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os animais foram sacrificados, seguindo os princípios de cuidados com animais, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do CBIOTec/UFPB, parecer nº 0609/10.

4.2 Substâncias utilizadas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: Cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), 17 β -estradiol (Sigma) e diosgenina. O 17- β estradiol foi solubilizado em dimetil sulfoxido e a diosgenina em cremofor. Soluções-estoque de ambos foram preparadas antes dos experimentos. Todas as soluções foram mantidas a 0°C e quando necessário, as drogas foram diluídas em água destilada para os experimentos *in vitro*.

4.3 Sais utilizados

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (MERCK) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (Sigma).

5 MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foi utilizada uma forma de abordagem *in vitro* com preparações de artéria mesentérica superior isolada de rato para avaliar o efeito biológico da diosgenina e estradiol. Os ensaios farmacológicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Universidade Federal da Paraíba.

5.1 Preparação dos tecidos vasculares

Na realização do presente estudo utilizou-se artéria mesentérica superior isolada de ratos com ou sem endotélio funcional. Para tanto, os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical, a artéria em questão foi identificada, colocada em uma placa de Petri contendo solução fisiológica de Tyrode a 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), para dissecação com retirada do tecido adiposo. Posteriormente, seccionou-se a artéria em anéis medindo de 1 a 2 mm, que foram suspensos em haste de metal por fio de algodão, colocados em cubas para órgãos isolados também contendo mistura carbogênica e 10 mL de solução fisiológica de Tyrode. A fim de se obter anéis sem endotélio funcional, realizou-se leve atrito entre as paredes deste e a haste de metal. A tensão produzida pela artéria foi mensurada em gramas (g) e registrada através de um transdutor acoplado a um sistema de aquisição. Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de uma hora, trocando-se a solução a cada 15 minutos. Ao final deste período, adicionou-se 10⁻⁵ M de fenilefrina em cada cuba, e sob o componente tônico da contração obtida por esse agente contracturante foi adicionado 10⁻⁵ M de acetilcolina, a fim de verificar a percentagem de endotélio presente em cada anel. Foram considerados com endotélio os anéis que apresentavam relaxamento superior a 90% e sem endotélio os anéis que apresentavam relaxamento inferior a 10%. Após a verificação do endotélio, os anéis foram lavados com solução de Tyrode para remoção das substâncias e estabelecimento do tônus basal. Em seguida, algumas substâncias foram incubadas, conforme os protocolos experimentais.

Neste estudo, foram utilizados ratos porque, segundo WENDY et. al. em 2005, a artéria mesentérica superior destes animais, que foi o leito vascular utilizado,

é mais sensível aos efeitos modulatórios do estradiol do que as artérias mesentéricas superiores de ratas.

5.2 Protocolos experimentais

5.2.1 Avaliação do efeito de diosgenina ou 17- β estradiol sob o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio vascular

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) ou 17- β estradiol (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) foram adicionadas cumulativamente sob o tônus basal destas preparações. As respostas obtidas na ausência destas substâncias (basal) foram comparadas com aquelas obtidas na presença das mesmas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio funcional.

5.2.2 Avaliação do efeito vasorelaxante induzido pela diosgenina ou 17- β estradiol em artéria mesentérica superior pré-contraída com fenilefrina

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) ou 17- β estradiol (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) foram adicionadas cumulativamente aos anéis mesentéricos pré-contraídos com fenilefrina (10^{-5} M). O efeito vasorelaxante de diosgenina e do 17- β estradiol foi avaliado em anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional intacto e em anéis com o endotélio funcional removido. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional foram analisados (ver tópico referente à análise estatística).

5.2.3 Efeito do relaxamento induzido por diosgenina após administração do 17- β estradiol

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, os anéis de artéria mesentérica superior foram incubados com 17- β estradiol (10^{-4} M) por 30 minutos, em seguida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) foi induzida e sob a fase tônica dessa contração, concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) foram adicionadas cumulativamente às preparações. O efeito vasorelaxante de diosgenina, após administração de 17- β estradiol por 30 minutos, foi avaliado em anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional intacto e em anéis com o endotélio funcional removido. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional foram analisados (ver tópico referente à análise estatística).

5.3 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para estudar o efeito vasorelaxante induzido por diosgenina e 17- β estradiol, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: A eficácia farmacológica (E_{max} , resposta máxima induzida pela substância) e a potência farmacológica (pD_2 , logaritmo negativo da concentração em molar de uma substância que induz 50% do efeito máximo, $-\log CE_{50}$).

As análises estatísticas foram feitas utilizando teste “*t*” de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. O programa utilizado para análise dos dados foi Graph Pad Prism 5.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito de diosgenina ou 17- β estradiol sob o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio vascular

A administração cumulativa de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio funcional não alterou o tônus basal desta preparação (figura 3). Do mesmo modo, após a remoção do endotélio funcional, concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) também não foram capazes de alterar o tônus basal destas preparações (figura 4). Resultados similares foram observados após administração cumulativa de concentrações crescentes de 17- β estradiol (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) na presença do endotélio funcional (figura 5) e após a remoção do mesmo (figura 6). Estes resultados em conjunto sugerem que diosgenina e o 17- β estradiol parecem não modificar o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Figura 3 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença do endotélio vascular (n=6).

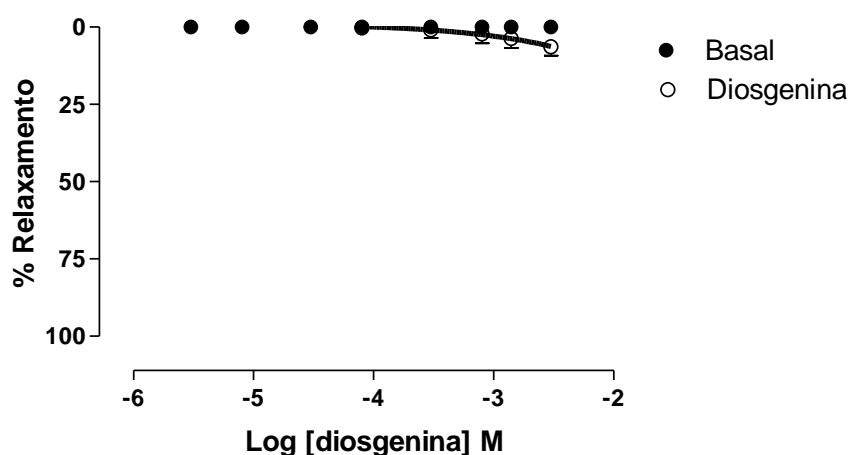


Figura 4 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular (n=8).

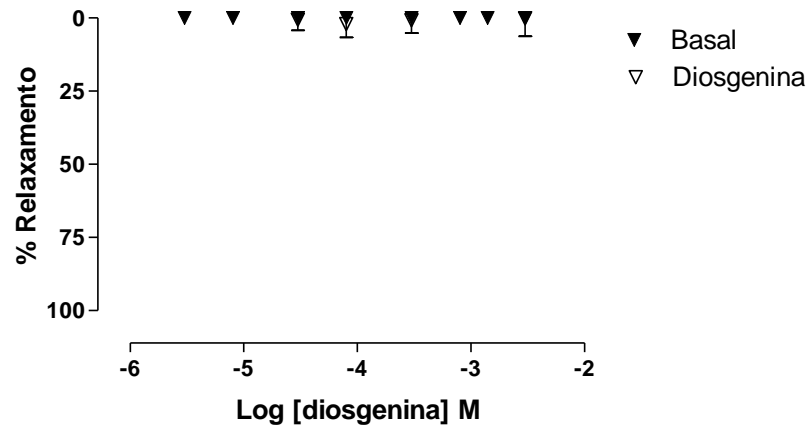


Figura 5 Efeito de concentrações crescentes de 17- β estradiol (10^{-10} – 10^{-4} M) sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença do endotélio vascular (n=5).

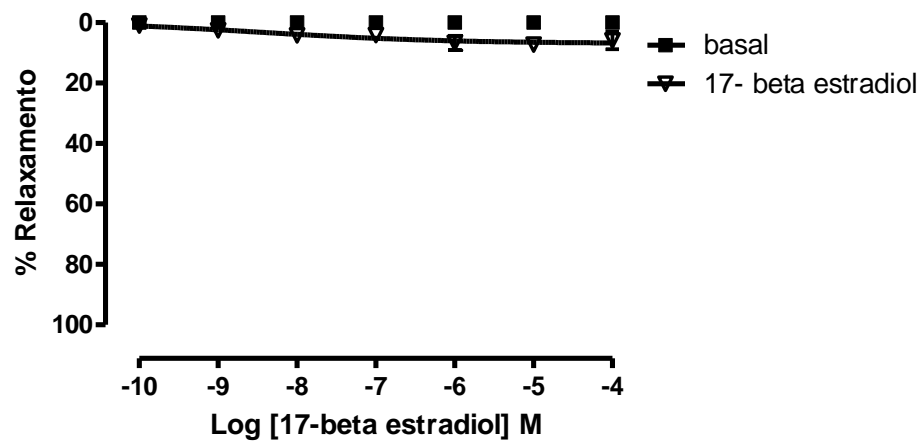
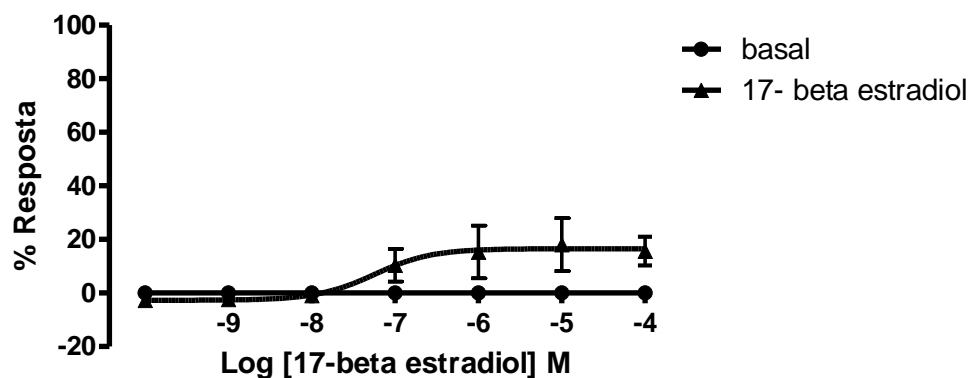


Figura 6 Efeito de concentrações crescentes de 17- β estradiol (10^{-10} – 10^{-4} M) sob o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular (n=5).



6.2 Avaliação do efeito vasorrelaxante induzido pela diosgenina ou 17- β estradiol em artéria mesentérica superior pré-contraída com fenilefrina

A administração cumulativa de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio funcional induziu um relaxamento dependente de concentração com $E_{M\acute{A}X} = 77 \pm 4,6$ % (figura 7). Do mesmo modo, após a remoção do endotélio funcional, concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) também induziram um relaxamento dependente de concentração com $E_{M\acute{A}X} = 66 \pm 10,9$ % (figura 8). Esses resultados sugerem que diosgenina apresenta efeito relaxante dependente e independente do endotélio funcional. Os mesmos vão ao encontro dos resultados obtidos por DIAS (2007) que demonstraram que diosgenina induz efeito vassorelaxante dependente de endotélio em anéis mesentéricos de ratos normotensos, mediado pela liberação de óxido nítrico através da ativação de receptores muscarínicos e uma possível ativação de canais para K^+ . Além de efeitos relaxantes independentes do endotélio funcional que envolvem bloqueio dos canais para Ca^{2+} operados por voltagem.

Resultados similares foram observados após administração cumulativa de concentrações crescentes de 17- β estradiol (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) na presença do endotélio funcional com $E_{M\acute{A}X} = 66,1 \pm 4,7$ % e após a remoção do mesmo com $E_{M\acute{A}X} = 73,5 \pm 11,6$ % (figura 9). Mostrando que assim como diosgenina 17- β estradiol, apresenta um efeito relaxante dependente e independente do endotélio funcional. Estudos de Andersen (1999) mostraram que os efeitos agudos do vasorelaxamento de 17- β estradiol são mediados através de vias de endotélio e óxido nítrico-dependentes. Segundo Wendy (2011) o 17- β estradiol é capaz de ativar canais de potássio ativados por cálcio de larga condutância ($BK_{c\acute{a}lcio}$) e ativar a adenilato ciclase, melhorando o relaxamento e reduzindo a contração em artéria coronária de suínos. Além disso, vem sendo relatado na literatura que a suplementação do estrogênio causa relaxamento em vasos pré-contraídos na ausência do endotélio funcional, incluindo artéria mesentérica (SHAW, 2000), coronária (MUGGE, 1993) e aorta (JIANG, 1991).

Figura 7 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN (10^{-5} M) na presença do endotélio vascular (n=7).

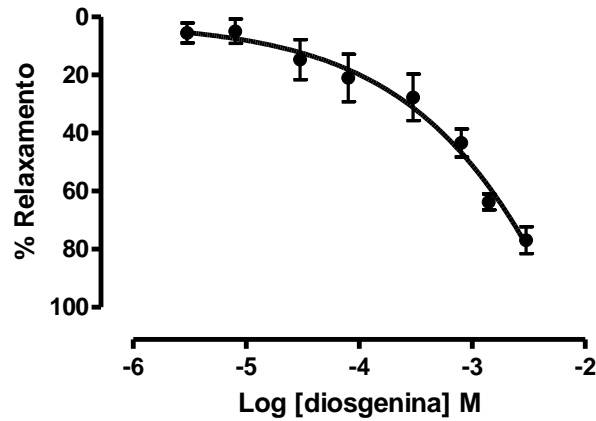


Figura 8 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN (10^{-5} M) na ausência do endotélio vascular (n=7).

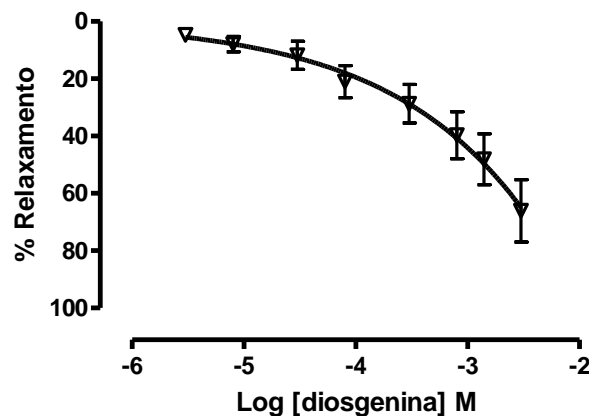
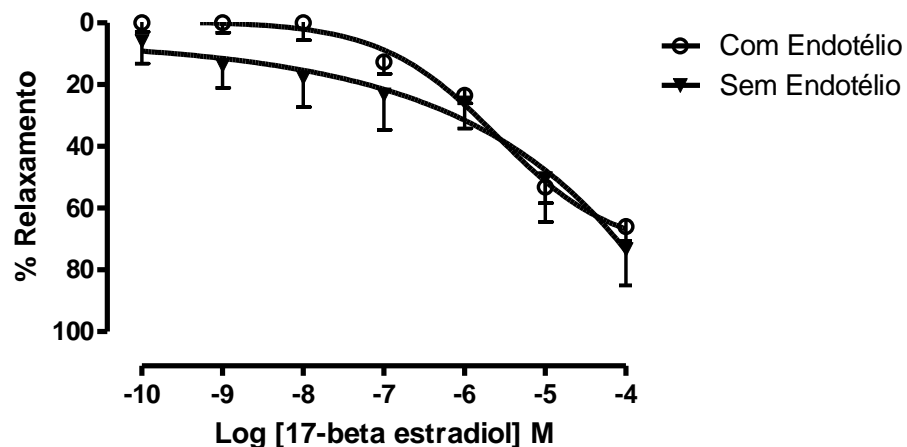


Figura 9 Efeito de concentrações crescentes de 17-β estradiol (10^{-10} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN (10^{-5} M) na presença e na ausência do endotélio vascular (n=6).



6.3 Efeito do relaxamento induzido por diosgenina após administração do 17- β estradiol

Concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) promoveram um relaxamento em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio funcional com $pD_2 = 3,3 \pm 0,09$ e este efeito relaxante foi significativamente potencializado após administração de 17- β estradiol (10^{-4} M) por 30 minutos ($pD_2 = 4,1 \pm 0,009^{***}$, $*p < 0,05$) (figura 10). Do mesmo modo, após a remoção do endotélio funcional, o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} , 7×10^{-6} , 2×10^{-5} , 7×10^{-5} , 2×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} e 2×10^{-3} M) ($pD_2 = 3,4 \pm 0,09$) também foi significativamente potencializado após administração de 17- β estradiol (10^{-4} M) por 30 minutos ($pD_2 = 4,1 \pm 0,009^{***}$, $*p < 0,05$) (figura 11), sugerindo que o 17- β estradiol é capaz de potencializar o relaxamento induzido por diosgenina em artéria mesentérica superior isolada de rato na presença e na ausência do endotélio funcional.

O resultado da potencialização do efeito relaxante de diosgenina em anéis com endotélio funcional vai ao encontro de alguns estudos que relatam que altos níveis de estrogênio em animais está associado com o maior relaxamento dependente do endotélio de artérias coronárias para uma variedade de agentes (GISCLARD et al, 1988; MILLER e VANHOUTTE, 1991).

Adicionalmente, outros estudos mostraram que anéis de artéria femoral de coelhos tratados com 17- β estradiol apresentaram um relaxamento endotélio dependente aumentado à acetilcolina (BELL et al., 1995). Estes estudos em conjunto, sugerem que as respostas relaxantes das artérias dependentes do endotélio, podem ser moduladas por hormônios esteroidais.

Teoh (1999) ao realizar experimentos in vitro observou que a incubação a curto prazo de anéis isolados de artéria coronária de suínos (20 min) com 1 nM do 17- β estradiol provocou potencialização significativa no relaxamento induzido pelo cromakalim, levcromakalim e nitroprussiato de sódio, que são agentes de relaxamento independente do endotélio. No ano seguinte e usando o mesmo modelo, demonstrou que esse mecanismo de potencialização independente de endotélio envolve a cascata do AMP cíclico e parece não requerer as vias de sinalização genômicas (TEOH et. al., 2000).

Esses mecanismos dependentes e independentes do endotélio podem explicar em partes a potencialização no efeito relaxante de diosgenina provocada pelo 17- β estradiol. Entretanto, outros ensaios são necessários para o esclarecimento desse mecanismo de potencialização.

Figura 10 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN (10^{-5} M) na presença do endotélio vascular antes e após administração de 17- β estradiol (10^{-4} M) (n=5).

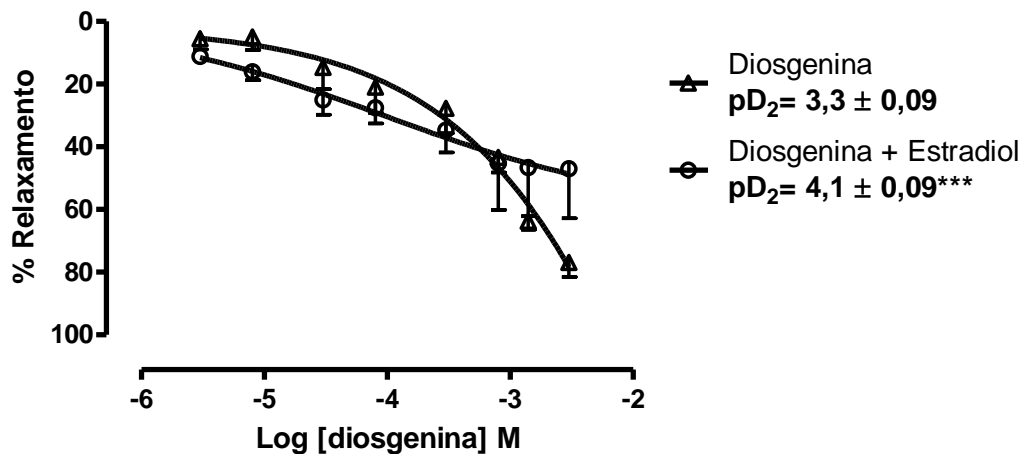
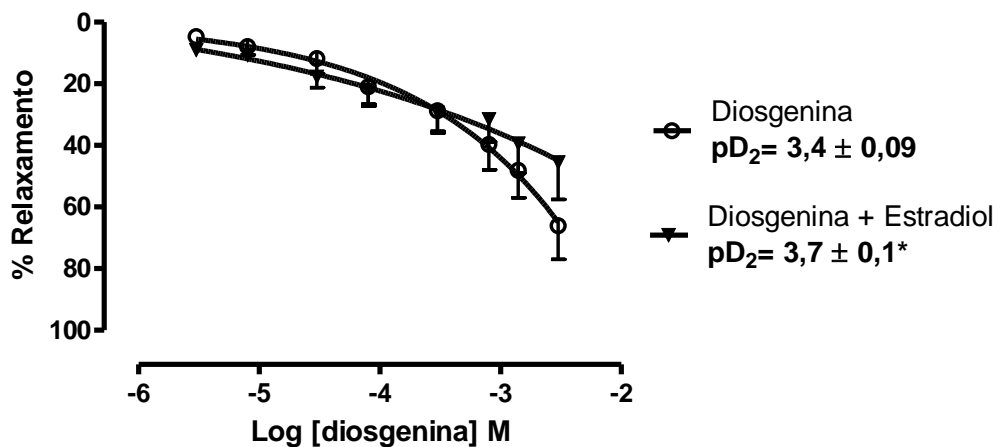


Figura 11 Efeito de concentrações crescentes de diosgenina (2×10^{-6} – 2×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídas com FEN (10^{-5} M) na ausência do endotélio vascular antes e após administração de 17- β estradiol (10^{-4} M) (n=5).



7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vitro*, demonstrou que diosgenina, fitoestrógeno estudado e 17- β estradiol, principal estrógeno produzido pela mulher parecem não alterar o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato e que os efeitos relaxantes induzidos por diosgenina e pelo 17- β estradiol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato apresentam um perfil de relaxamento bastante parecido, pois ambos possuem dois mecanismos distintos, um dependente e outro independente do endotélio vascular. Além disso, o relaxamento induzido pela diosgenina parece ser potencializado na presença do estradiol.

Entretanto, estudos posteriores serão necessários para melhor elucidar o mecanismo pelo qual o estradiol potencializa o relaxamento da diosgenina,

REFERÊNCIAS

- ALICE LAI SHAN AU; CHING CHI KWOK; ALLEN TING CHUN LEE; YIU WA KWAN; MACEY MEI SZE LEE; RONG-ZHEN ZHANG; SAI MING NGAI; SIMON MING YUEN LEE; GUO-WEI HE; KWOK PUI FUNG. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca^{2+} -activated K^+ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. **European Journal of Pharmacology**. 502: 123-133, 2004.
- Andersen, H.L., Weis, J.U., Fjalland, B., Korsgaard, N., 1999. Effect of acute and long-term treatment with 17-h-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. **Br. J. Pharmacol.** 126, 159–168
- BELL, D.R.; RENSBERGER, H.J.; KORITNIK, D.R.; KOSHY, A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. **Am. J. Physiol.** 268: H377–H383, 1995.
- BELL, D. R.; RENSBERGER, H. J.; KORITINIK, D. R.; KOSHY, A.; Noradrenergic Vasorelaxation of Porcine Coronary Arteries is Enhanced by Direct Acute Exposure to 17β – Estradiol. **Gen. Pharmac.** 26, 1289-1294, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa**. v. 1, n. 9, p. 1-192, 2008
- CRAVO, A. B. **Frutas e Ervas que curam**. São Paulo – SP: Ed. Húmus, 1999.
- DIAS, Katy Lísias Gondim. **Avaliação da atividade cardiovascular de fitoestrógenos e caracterização do mecanismo de ação de diosgenina em ratos: estudos *in vivo* e *in vitro***. 2006. 115f. (tese doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- DIAS, K. L. G.; CORREIA, N. A.; PEREIRA, K. K. G. et al. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**. 574, 172-178, 2007.
- GILLIGAN, D. M.; QUYYUMI, A. A.; CANNON, R. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. **Circulation**. 89, 2545-2551, 1994.
- GISCLARD, V.; MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Effect of 17β -estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 244, 19-22, 1988.
- HAYASHI, T.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J.; CHAUDHURI, G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89, 11259–11263, 1992.
- HAYASHI, T.; YAMADA, K.; ESAKI, T.; KUZUYA, M.; SATAKE, S.; ISHIKAWA, T.; HIDIKA, H.; IGUCHI, A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 25,847– 855, 1995.
- HUGHES, J.; The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. **Biomed. Sci. Instrum.** 37, 281– 286, 2001.

- JIANG, C.; SARREL, P. M.; LINDSAY, D. C.; POOLE-WILSON, P. A.; COLLINS, P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17β -estradiol *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.** 104, 1033–1037, 1991.
- JUAREZ-OROPEZA, M.A.; DIAZ-ZAGOYA, J.C.; RABINOWITZ, J.L. *In vivo* and *in vitro* studies of hypocholesterolemic effects of diosgenin in rats. **Int. J. Biochem.** 19, 679– 683, 1987.
- KAUSER, K.; RUBANYI, G.M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. **Am. J. Physiol.** 267, H2311 –H2317, 1994.
- KNOT, H.J.; LOUNSBURY, K.M.; BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca^{2+} and eNOS activity. **Am. J. Physiol.** 276, H961– H969, 1999.
- LANTIN-HERMOSO, R.L.; ROSENFELD, C.R.; YUHANNA, I.S., GERMAN, Z.; CHEN, Z.; SHAUL, P.W. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. **Am. J. Physiol.** 273, L119–L126, 1997.
- LIMA, S.M.R.R.; ALDRIGHI J.M.; COLOMBO, F.C.; GEORGI, D.M.A. Hipertensão arterial e climatério. **Hipertensão** 4 (2): 51-4, 2001.
- LIMA, S. M. R. R.; BELLÓ-KLEIN, A.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MONTE, O.; IRIGOYEN, M. C.; ANGELIS, K. Effects of 17β -estradiol replacement on cardiac oxidative damage in rats submitted to ovarian hormone deprivation. **Rev. Bras. Ginecologia e Obstetricia.** 29(1):27-33, 2007.
- MARQUES, D. A.; SOARES, S. S.; MEDEIROS, F. C.; MEDEIROS, M.A. Efeitos da isoflavona e estradiol sobre o perfil lipídico (cadioprotetor) em ratas ooforectomizadas como modelo de menopausa. **Rev. Rene.** v.7 n.1 Fortaleza abr. 2006.
- MCNEILL, J. R.; JURGENS, T. M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.** v.84, p.803 - 821, 2006.
- MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. **Am. J. Physiol.** 261, (Reg. Integra. Comp. Physiol. 30,) R1022-1027, 1991.
- MUGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M.; KUHN, M.; LICHTLEN, P. R. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17β -estradiol *in vitro*. **Cardiovasc. Res.** 27, 939–1942, 1993.
- OGITA, H.; NODE, K.; LIAO, Y.; ISHIKURA, F.; BEPPU, S.; ASANUMA, H. . Raloxifene prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in pressure-overloaded mice. **Hypertension.** 43: 237–242, 2004.
- RECKELHOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension.** 37, 1199–1208, 2001.
- ROETERS, V.; LENNEP, J. E.; WESTERVELD, H. T.; ERKELENS, D.W. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. **Cardiovasc. Res.** 53, 538–549, 2002.

- ROSSELLI, M., Imthurn, B., Keller, P.J., Jackson, E.K., Dubey, R.K. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate: a two-year follow-up study. **Hypertension**. 25, 848–853, 1995.
- SHAW, L.; TAGGART, M. J.; AUSTIN, C. Mechanisms of 17 β -estradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. **Br. J. Pharmacol.** 129, 555–565, 2000.
- SHWAERY, G.T.; VITA, J.A.; KEANEY, J.F. JR. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. **Circulation**. 1997.
- STEFANO, G.B.; PREVOT, V.; BEAUVILLIAIN, J.; CADET, P.; FIMIANI, C.; WELTERS, I.; FRICCHIONE, G.L.; BRETON, C.; LASSALLE, P.; SALZET, M.; BILFINGER, T.V. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. **Circulation**. 101, 1594– 1597, 2000.
- TEOH, H.; LEUNG, S.W.S.; MAN, R.Y.K. Short-term exposure to physiological levels of 17 β -estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery. **Cardiovasc. Res.** 42, 224 \pm 231, 1999.
- TEOH, H.; MAN, R.Y.K. Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17 β -estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade. **British Journal of Pharmacology**. 129, 1739 \pm 1747, 2000.
- WENDY KEUNG, PAUL M. VANHOUTTE, RICKY Y.K. MAN. Nongenomic responses to 17- β estradiol in male rat mesenteric arteries abolish intrinsic gender differences in vascular responses. **British journal of pharmacology**. 146, 1148-1155 2005;
- WENDY KEUNG, MATTHEWLY. CHAM, EVA Y. W. HO, PAUL M. VIANHOUTTE, RICKY Y. K. MAN. Non genomic activation of adenylyl cyclase and protein kinase G by 17- β estradiol in vascular smooth muscle of the rat superior mesenteric artery. **Pharmacological research** .YPHRS:2315 2011;
- WILLIAMS, J. K.;ADAMS, M. R.; HERRINGTON, D. M.; CLARKSON, T. B.; Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. **J. Am. Coll. Cardiol.** 20. 452-457, 1992.
- ZHOU, BO.; SUN, Q.; CONG, R.; GER, H. et al. Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: A meta-analysis. **Gynecologic oncology**.108, 641-651, 2008.